

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 555 589

(21) N° d'enregistrement national :

83 19110

(51) Int Cl^a : C 08 B 37/02; A 61 K 31/725.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 30 novembre 1983.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 22 du 31 mai 1985.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(71) Demandeur(s) : Société anonyme dite : CHOAY SA —
FR.

(72) Inventeur(s) : Monique Massat, épouse Mauzac, Jacque-
line Dorgebray, épouse Jozefonvicz, et Marcel Jozefon-
vicz.

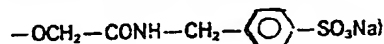
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Plasseraud.

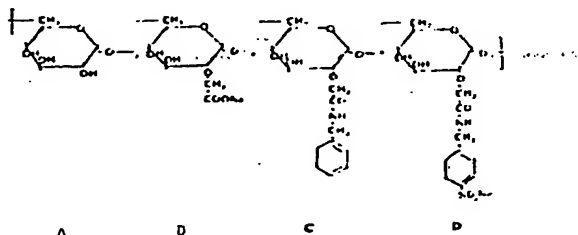
(54) Nouveaux dérivés du dextrane à activités anticoagulante en anti-inflammatoire, leur procédé de préparation et
utilisation de ces dérivés en tant qu'anticoagulants et en tant que substituts du plasma sanguin.

(57) La présente invention est relative à de nouveaux dérivés
du dextrane à activités anticoagulante et anti-inflammatoire, et
à leur procédé de préparation.

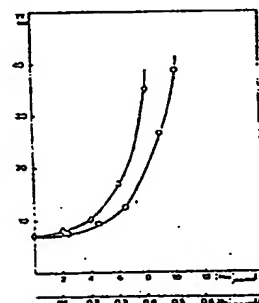
Ces dérivés, de formule générale ci-après, sont caractérisés
en ce qu'ils contiennent au moins 35 % du motif B
(—OCH₂—COONa), au moins 5 % du motif D :



et en ce que leur masse moléculaire est au moins égale à
8 000 :



Application : utilisation de ces dérivés en tant qu'anticoa-
gulants et en tant que substituts du plasma sanguin.



FR 2 555 589 - A1

- 1 -

La présente invention est relative à de nouveaux dérivés du dextrane à activités anticoagulante et anti-inflammatoire ainsi qu'à leur procédé de préparation.

De très nombreuses études ont été entreprises par différents Chercheurs afin de déterminer et de définir les propriétés chimiques, physiques et physico-chimiques responsables de l'activité anticoagulante de l'héparine, agent anti-coagulant naturel du sang;

De nombreux Chercheurs ont également entrepris des études afin de suppléer l'héparine par différents produits synthétiques, parfaitement définis (Cf. les différents travaux des Inventeurs et notamment le Brevet français 2 461 724, la Demande de Brevet Européen 80401053.6 ; le "Proc.Third Meet., I.S.A.O., 1981, 5 (Suppl.), 504-506 ; le Biomaterials 1982, 3, 221-224, etc...).


Les Inventeurs ont ainsi mis au point et décrit (Brevets français 2 461 724 et Européen 80401053.6 précédemment cités) des produits doués de propriétés anticoagulantes constitués par des polymères comportant des groupes :

$-SO_3R_1$, $-R_3SO_3R_1$, $-SO_2R_2$, $-R_3-SO_2-R_2$ et $-CH_2-CO-NH-CHR-COOH$ dans lesquels :

R_1 est un atome d'hydrogène ou d'un métal physiologiquement compatible,

R_2 est un reste d'acide aminé lié au pont $-SO_2-$ par la fonction amine,

R_3 est un groupe $-CH_2-CO-NH-R_4$ dans lequel R_4 représente un radical alkyle, aryle ou alkylaryle, ou

$-CH_2-$  substitués ou non

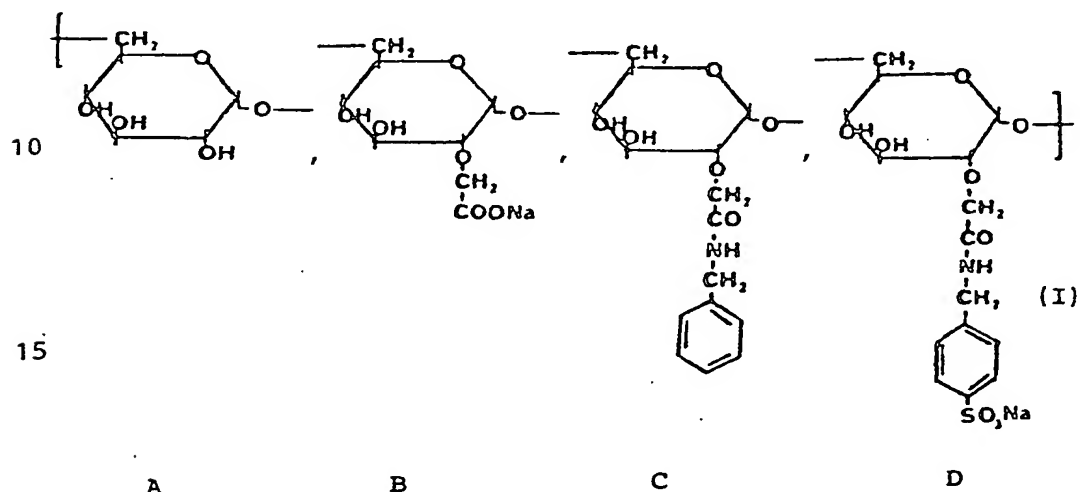
et

R représente la chaîne latérale d'un acide aminé.

En poursuivant leurs travaux et notamment sur des dérivés de dextrans, les Inventeurs ont mis au point de nouveaux dérivés de dextrans ne comportant pas d'acides aminés, présentant à la fois une activité anticoagulante, une activité antiinflammatoire, et pouvant avantageusement être utilisés en

tant qu'anticoagulants et substituts du plasma sanguin.

La présente invention a pour objet de nouveaux dérivés de dextrans à activités anticoagulante et antiinflammatoire et pouvant être utilisés en tant qu'anticoagulants et en tant que substituts du plasma sanguin et représentés par la formule I ci-après :



lesquels dérivés sont caractérisés en ce qu'ils contiennent 20 au moins 35% du motif B ($-\text{OCH}_2-\text{COONa}$), au moins 5 % du motif D ($-\text{OCH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na}$) et en ce que leur masse moléculaire est au moins égale à 8000.

L'ensemble : motifs non substitués (A) plus motifs comprenant la benzylamine non sulfonée (C) doit être 25 inférieur à 60%.

Selon un mode de réalisation préféré de l'objet de l'invention, le dérivé du dextrane contient 40 à 50 % du motif carboxylique B ($-\text{OCH}_2-\text{COONa}$), et au moins 15 % du motif sulfoné D ($-\text{OCH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na}$) et sa masse 30 moléculaire est d'environ 20 000 à 30 000.

Les Inventeurs en préparant toute une gamme de dérivés, ont pu ainsi mettre en évidence que, dès que le pourcentage des motifs dextrane pourvus du groupement carboxylique B est inférieur à 35%, l'activité anticoagulante 35 devient insignifiante et il en est de même en absence totale

du groupement benzylsulfonate D. D'autre part, l'activité anticoagulante croît jusqu'à une teneur de 50% en substituant B et 15% environ en substituant D.

Le Tableau I ci-après résume les résultats obtenus sur 22 échantillons différents.

TABLEAU I

Composition de l'échantillon %			Activité antithrombique a_{uTh}/mg
B	C	D	
30	0	0	0
37	21	0	0
37	11	9	1
37	15	5	1
70	7	1	1
71	7	2	1
37	15	6	1
47	1	3	2
40	12	3	3
40.5	4	4	4
40.5	4	10	6
60	14	5	16
43	0	15	14
58	5	6	18
45	0	5	20
50	3	10	22
43	4	11	23
49	1	12	29
68	4	12	31
71.5	0	10	40
75	0	14	65
45	0	14	70

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de dérivés conformes à la présente invention, lequel procédé est caractérisé par les étapes suivantes :

1ère étape : carboxyméthylation contrôlée des dextrans,

2ème étape : fixation de la benzylamine ,

3ème étape : sulfonation du noyau aromatique de la benzylamine ,

4ème étape : fractionnement en masse moléculaire des dextrans et élimination des dextrans de bas poids moléculaire (< 8000),

5ème étape : lavage, conditionnement et lyophilisation.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, la séparation des dextrans de bas poids moléculaire est effectuée en premier, suivie des étapes de carboxyméthylation, fixation de la benzylamine, sulfonation et conditionnement.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à un exemple de préparation du produit conforme à la présente invention, ainsi qu'à des compte-rendus analytique et pharmacologique qui mettent en évidence les remarquables propriétés du médicament conforme à la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemple et compte-rendus sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, mais n'en constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE DE PREPARATION

Les opérations décrites ci-après sont effectuées sur un échantillon de dextrane d'un poids moléculaire supérieur à 8 000, la séparation ayant été effectuée par chromatographie liquide.

1ère étape : carboxyméthylation des dextrans

Cette étape est inspirée par les travaux de F. ANTONINI & Coll. (Giorn. Biochi. 14, 88, 1965).

Dans un ballon de 1 litre muni d'un système d'agitation et immergé aux deux tiers dans un bain [glace + sel (-4°C)], on dissout 48,6 g de dextrane (0,30 Mole) dans 400 ml de soude 6N (2,4 Moles). On laisse sous agitation à -4°C pendant 20 minutes.

Dans le ballon, on introduit petit à petit (durée d'introduction 10 minutes) 100 g de ClCH_2COOH (1,05 Moles)

On porte la température à 70°C et on maintient à cette température et sous agitation pendant 20 minutes.

On refroidit en immergeant le ballon aux deux

tiers dans un bain de glace.

On porte le pH à la valeur 7 par de l'acide acétique.

On précipite le produit dans 3 litres de 5 méthanol.

On le lave au méthanol.

On le sèche dans un étuve sous vide à 40°C environ.

Par cette méthode, on substitue environ 30% des cycles dextranes, sans dégradation des chaînes macromoléculaires. Les 10 substitutions plus importantes sont obtenues en répétant plusieurs fois (n fois) cette opération selon le Tableau II ci-après :

TABLEAU II

	n (nombre de carboxyméthylation)	% de motifs dextranes carboxyméthylés
15	1	30-32
	2	45-50
	3	60-65
	4	75-80
20	5	90-98

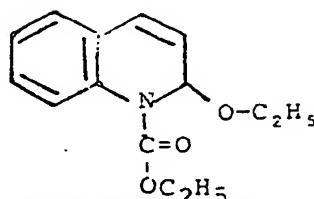
2ème étape : Fixation de la benzylamine

Cette étape est inspirée par les travaux de P.V. SUNDARAM [Biochem. Biophys. Res. Comm. 61, 717, 1974].

25 Dans un ballon de 2 litres, on dissout sous agitation à température ambiante 40 g de carboxyméthyl-dextrane à 90% de motifs dextranes carboxyméthylés (préparé au cours de la 1ère étape) dans 290 ml d'eau.

On ajuste le pH à environ 3,5 par de l'acide 30 chlorhydrique 1N.

On verse 89 g (0,360 Mole) de N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline (E.E.D.2.) de formule :



5

dissous dans 710 ml d'éthanol absolu.

On maintient sous agitation pendant une demi-heure.

On ajoute 40 ml de benzylamine (0,36 Mole) et on
10 laisse sous agitation une nuit.

On évapore le mélange presque à sec.

On précipite dans 2 litres de méthanol.

On lave au méthanol et on sèche à l'étuve à
vide à 40°C.

15 3ème étape : Sulfonation des noyaux aromatiques de la benzylamine

12 g de produit obtenu au cours de la 2ème
étape et comportant 1 mmole /g de benzylamine sont dispersés
sous agitation dans 240 ml de chlorure de méthylène.

2,4 ml d'acide chlorosulfonique (0,036 Mole)
20 sont ajoutés lentement.

On laisse sous agitation une nuit.

On filtre, on lave à l'éthanol.

On sèche à l'étuve à vide à 40°C.

Par cette méthode, on substitue jusqu'à environ
25 la moitié des cycles aromatiques de la benzylamine.

Pour obtenir les taux de sulfonation désirés, on
renouvelle l'opération plusieurs fois.

4ème étape : Lavages et conditionnement

Le produit obtenu en fin de la 3ème étape est
30 dissous dans une solution aqueuse de soude et le pH est
maintenu à 8 pendant 2 heures.

Il est ensuite lavé à l'eau, équilibré à pH 7,35
par du tampon de Michaelis, puis relavé à l'eau. Toutes les
opérations sont effectuées en utilisant la méthode d'ultra-
35 filtration (membranes semi-perméables à seuil de coupure adapté)

Le produit est finalement lyophilisé.

Le procédé conforme à la présente invention permet donc de faire varier à volonté le taux des motifs B et D, en fonction du degré d'activité anticoagulante recherché.

TESTS DE COAGULATION

5 Méthode :

Les temps de thrombine et de reptilase sont déterminés automatiquement à 37°C par un coagulomètre Dade KC1.

Le dérivé du dextrane est dissous à concentration adéquate dans du tampon de Michaelis.

- 10 Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) est stocké à -80°C et mis à 37°C au moment de l'emploi.

La thrombine est diluée dans du tampon de Michaelis et mise à 4°C au moment de l'emploi.

La reptilase est diluée dans l'eau et mise à 37°C.

15 Activité anticoagulante

- 20 L'activité anticoagulante (a) est déterminée à partir des temps de thrombine du PPP en présence de diverses concentrations de polymère. L'activité, a, est définie comme le nombre d'unités de thrombine inactivées par milligramme de polymère (uTh/mg). Cette quantité de thrombine inactivée est déterminée à partir d'une courbe de calibration.

Dans les mêmes conditions, l'héparine commerciale a un coefficient d'activité, a, égal à 4 000 uTh/mg.

- 25 Il faut noter que les temps de reptilase ne sont pas allongés en présence de polymère et donc le fibrinogène n'est pas altéré.

Les temps de thrombine sur fibrinogène sont égaux au temps témoin et la présence de l'antithrombine III est indispensable.

30 Variations de l'activité anticoagulante, a, en fonction des substituants

Ces variations sont représentées sur les figures 1 et 2.

- 35 La figure 1 représente le temps de thrombine de dérivés conformes à la présente invention (⊙). Le produit utilisé comporte 14% de motifs D et 42% de motifs B, compara-

tivement à l'héparine (\diamond) (173 u/mg).

Le système de coagulation est le suivant :

On incube 0,1 ml de la solution de polymère ou 0,1 ml de tampon de Michaelis (contrôle) avec 0,2 ml d'une solution de PPP pendant 5 minutes, à 37°C. On ajoute ensuite 0,1 ml de thrombine (20 u NIH/ml), puis on mesure le temps de coagulation.

La figure 2 reproduit l'activité antithrombique des dérivés de dextranses. :

2a représente l'influence de la variation du taux des motifs B pour des dérivés ayant différents taux des motifs D, et 2b représente l'influence du taux des motifs D pour un taux de motifs B stable et égal à $47,5\% \pm 2,5\%$.

Influence de la masse molaire

Deux méthodes de séparation sont possibles :

- 1°) on sépare dès le départ des produits de masses bien choisies et homogènes,
 - 2°) on procède en fin de synthèse à une séparation en fonction de la masse et on étudie l'évolution correspondante de l'activité :
- le produit est fractionné par chromatographie liquide sous basse pression en phase aqueuse.
- . Remplissage de la colonne : Séphadex G50
 - . Eluant : solution aqueuse de NaCl 0,2M
 - . Colonne: "LKB" (2,5 mm de diamètre et 1 m de long)
 - . Charge : 100 mg de produit dans 5 ml d'éluant.

Après passage sur cette colonne, le produit est fractionné selon sa masse moléculaire en 5 fractions. (Il a été vérifié par dosage chimique que la séparation s'effectuait uniquement en fonction de la masse).

La masse de chaque fraction a été déterminée par chromatographie d'exclusion liquide sous haute pression (90 bars) sur colonne "Merck Lichrospher" 100 diol, en milieu aqueux NaCl 0,2M, et après étalonnage de la colonne.

L'activité anticoagulante, a, de chaque fraction est résumée dans le Tableau III ci-après :

TABLEAU III

	Fraction	Masse	Activité a (uTh/mg)
	1	27 000	20
	2	19 000	14
5	3	15 000	8
	4	8 000	6
	5	6 300	3

Le produit avant séparation chromatographique présente les caractéristiques suivantes :

- très polydispersé ($\overline{M}_w = 15\ 600$ $\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = 2,1$)
 $(\overline{M}_n = 7\ 400$)
- activité "a": 8 uTh/mg

Action anticomplémentaire et antiinflammatoire

On étudie l'inhibition de la C3 convertase, alterne, complexe enzymatique capable de cliver la protéine C3, protéine de la voie alterne du système complémentaire.

En présence ou en absence d'anticorps spécifiques, le système complémentaire participe aux mécanismes de reconnaissance ou de défense de l'hôte vis-à-vis d'agents infectieux ou de cellules étrangères.

Méthode (M.D.KAZATCHKINE & Coll. / J.Clin.Invest. 67, 223, 1981)

On a au préalable préparé des hématies de mouton portant des molécules de C3b (petit fragment libéré par le clivage de C3).

Ces cellules sont mises en présence de quantités de protéines D, P, B (autres protéines de la voie alterne) suffisantes pour obtenir un site hémolytique par cellule.

Des fractions de 0,1 ml de cette suspension sont prélevées et ajoutées à 0,1 ml de tampon DGVB⁺⁺ (tampon Véronal + 0,1% de gélatine et contenant 0,15 mM de Ca⁺⁺ et 0,5 mM de Mg⁺⁺, dilué au 1/2 avec une solution de dextrose à 5% contenant 0,15 mM Ca⁺⁺ et 0,5 mM de Mg⁺⁺) seul ou contenant des quantités adéquates de dextrane modifié conforme à la présente invention.

Le mélange est incubé 30 minutes à 30°C sous agitation.

10

On ajoute 0,3 ml de sérum de rat dilué au 1/20ème dans du tampon GVB-EDTA (tampon Véronal + 0,1% de gélatine et contenant 0,04 M EDTA).

Les sites C3 convertase formés sont révélés
5 par une incubation de 60 minutes à 37°C sous agitation.

On arrête la réaction en ajoutant 1,6 ml de NaCl 0,15M.

Les tubes sont centrifugés et l'intensité de la lyse est déterminée par lecture des surnageants à 412 nm
10 par analyse au spectrophotomètre.

Le nombre de sites hémolytiques par cellule est calculé.

Activité inhibitrice

L'activité inhibitrice du produit testé est
15 exprimée en pourcentage d'inhibition de formation de la convertase par référence au tube témoin où la convertase a été formée en l'absence de dextrane modifié conforme à la présente invention.

Cette activité est exprimée en poids de produit
20 (à volume constant) nécessaire à 50% d'inhibition de formation de la convertase.

Cette activité varie en fonction des motifs.

Les résultats sont résumés sur la figure 3.

La Figure 3 annexée représente cette variation
25 pour des taux de motifs B variant de 10 à 80 % et pour des taux de motifs D égaux à :

9 - 12 % : courbe u
4 - 5 % : courbe v
30 2 - 3 % : courbe w
0% : 0

L'Héparine commerciale a une activité inhibitrice d'environ 1 à 2 µg, du même ordre que celle des meilleurs produits conformes à l'invention.

35 On constate que l'activité inhibitrice croît

en même temps que l'augmentation du taux de motifs D pour un taux de motifs B de 40-50%, l'augmentation du taux des motifs B au-delà de cette valeur n'apportant pas d'amélioration. Il est à noter également que l'évolution en fonction de motifs B et D de l'activité anticomplémentaire est parallèle à celle de l'activité antithrombique.

Toxicité :

Produit testé : motif B : 45%

motif D : 6%

10 activité "a" : 20 uTh/mg

Les tests de toxicité ont été effectués sur des souris d'environ 20 g par injection intraveineuse de 0,5 ml par souris, d'une solution de 40 mg/ml du dextrane modifié conforme à la présente invention dans du soluté NaCl isotonique. Ces tests ont démontré la totale innocuité du produit conforme à la présente invention: aucune réaction ni pendant l'injection, ni pendant 14 jours suivant l'injection, n'a été constatée.

20 Le dextrane modifié conforme à la présente invention peut parfaitement convenir en tant que substitut du plasma sanguin, comme cela a été préconisé pour des dextrans ordinaires (cf. les travaux de G. HEBERER dans Klin. Wschr. 45 874 /1967/ et de W. APPEL et Coll. : Angew. Chem. Intern. Ed. 7, 702 /1968/).

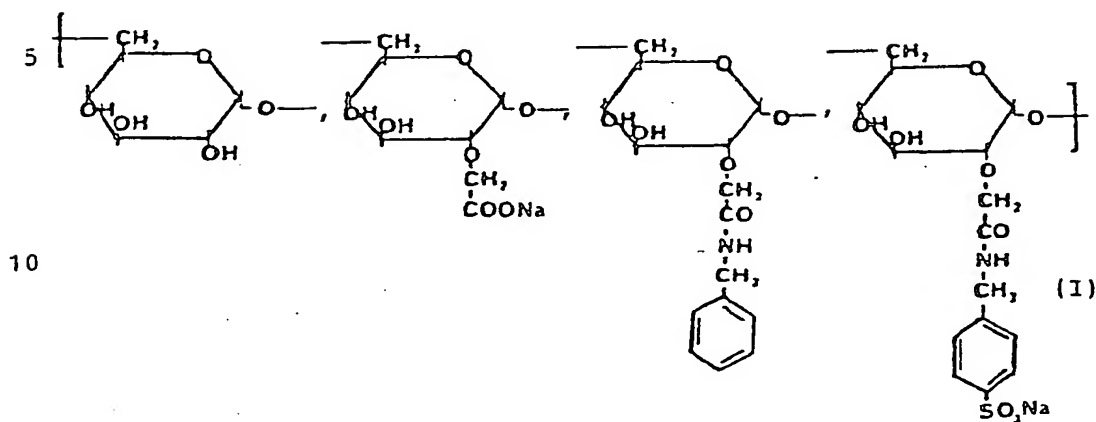
25 Le nouveau dérivé conforme à la présente invention peut également avantageusement être employé en tant que support pour la fixation de différentes substances à activité thérapeutique.

30 Il résulte de la description qui précède que l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, 35 ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1. Nouveaux dérivés de dextrane de formule I ci-

après :



15

A B C D
caractérisés en ce qu'ils contiennent au moins 35 %
du motif B (-OCH₂-COONa), au moins 5 % du motif D (-OCH₂-
CONH-CH₂--SO₃Na) et en ce que leur masse moléculaire
20 est au moins égale à 8000.

2. Dérivé selon la Revendication 1, caractérisé
en ce qu'il contient 40 à 50% du motif carboxylique B (-OCH₂-
COONa), et au moins 15 % du motif sulfoné D (-OCH₂-CO-NH-
CH₂--SO₃Na), et en ce que sa masse moléculaire est
25 d'environ 20 000 à 30 000.

3. Procédé de préparation des dérivés selon les
Revendications 1 et 2, caractérisé par les étapes suivantes :
1ère étape : carboxyméthylation contrôlée des dextrans,
2ème étape : fixation de la benzylamine ,
30 3ème étape : sulfonation du noyau aromatique de la benzylamine ,
4ème étape : fractionnement en masse moléculaire des dextrans
et élimination des dextrans de bas poids molé-
culaire (< 8000),
5ème étape : lavage, conditionnement et lyophilisation.

35

4. Procédé selon la Revendication 3, caractérisé

en ce que la séparation des dextrans de bas poids moléculaire est effectuée en premier, suivie des étapes de carboxyméthylation, fixation de la benzylamine, sulfonation et conditionnement.

- 5 5. Utilisation des dérivés selon les Reven-
dications 1 et 2 en tant qu'anticoagulants.
- 6. Utilisation des dérivés selon les Reven-
dications 1 et 2 en tant qu'antiinflammatoires.
- 7. utilisation des dérivés selon les Revendi-
10 cations 1 et 2 en tant que substituts du plasma sanguin.

PL. I/3

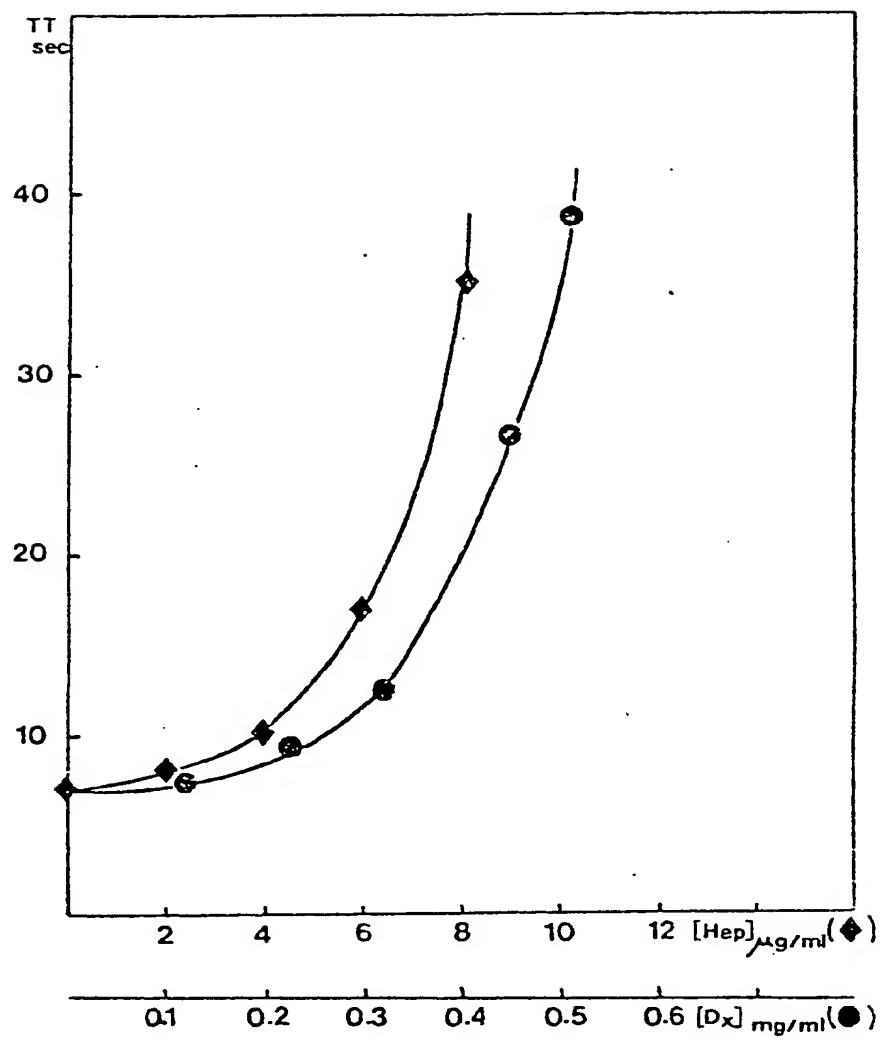
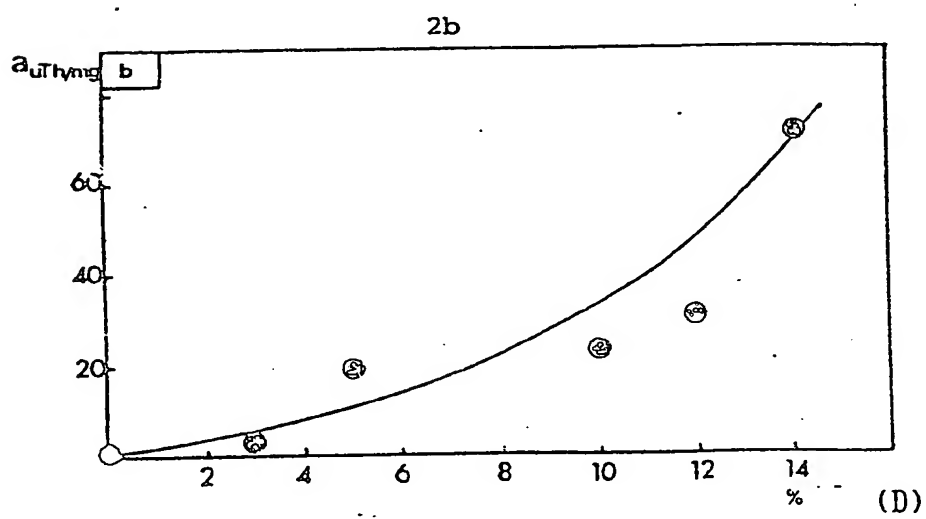
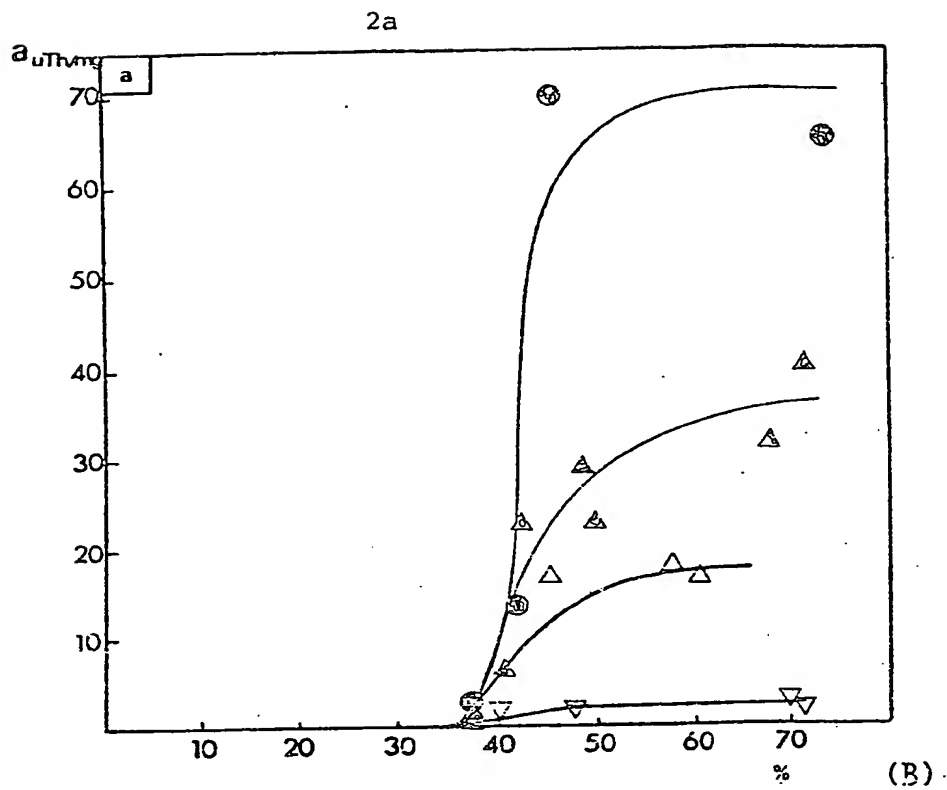


FIG. 1

PL.II/3

FIG.2



PL.III/3

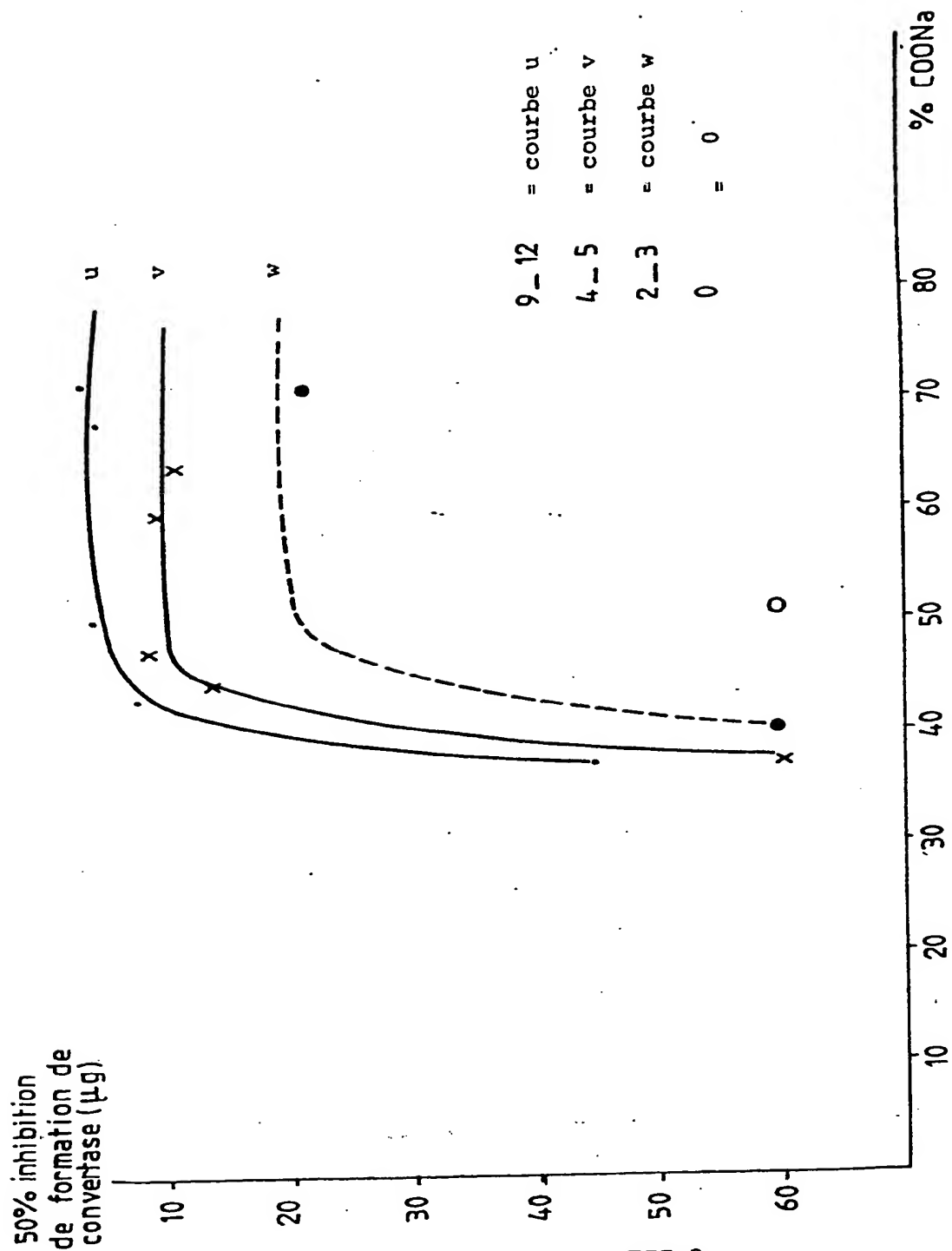


FIG. 3